



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 709 442

61 Int. Cl.:

A23K 50/00 (2006.01) **A23K 20/189** (2006.01) **A61P 1/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 11.12.2014 PCT/EP2014/077353

(87) Fecha y número de publicación internacional: 18.06.2015 WO15086735

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 11.12.2014 E 14811866 (4)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 31.10.2018 EP 3079483

(54) Título: Uso de la peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus Niger para mejorar el rendimiento animal

(30) Prioridad:

11.12.2013 EP 13196583

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 16.04.2019

(73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (50.0%) Het Overloon, 1 6411 TE Heerlen, NL y NOVOZYMES A/S (50.0%)

(72) Inventor/es:

BRUINS, MAAIKE JOHANNA; EDENS, LUPPO y LENEKE, NAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

DESCRIPCIÓN

Uso de la peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus Niger para mejorar el rendimiento animal

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención, que se define por las reivindicaciones, se refiere al uso de la peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger en una composición de pienso que contiene cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos para mejorar el rendimiento animal, reducir la excreción de nitrógeno y/o mejorar la digestibilidad de las proteínas. Además, la presente invención se refiere a una composición de pienso que contiene cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos para animales monogástricos que comprende peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger. La presente invención se refiere al descubrimiento de que la peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger es capaz de hidrolizar eficazmente inhibidores de alfa-amilasa/tripsina que están presentes en trigo, cebada y especies de cereales relacionadas, así como inhibidores de tripsina que están presentes en legumbres, semillas oleaginosas y tubérculos. Además, la presente invención puede utilizarse en un procedimiento para mejorar el rendimiento animal que comprende mejorar la proporción de conversión de pienso y/o mejorar la ganancia de peso diaria y/o reducir la inflamación intestinal y/o reducir la excreción de nitrógeno y/o mejorar la digestión de proteínas en un animal alimentado con un material de pienso que contiene inhibidores de alfa-amilasa y/o tripsina, comprendiendo dicho procedimiento administrar por vía oral una cantidad suficiente de peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger. También se refiere al pretratamiento del pienso con la peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger. La composición de pienso que comprende peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger se puede utilizar para reducir la inflamación intestinal en animales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

25

10

15

20

Las proteínas son nutrientes esenciales para los animales y los seres humanos. La mayor parte del ganado y los seres humanos obtienen una gran parte de las proteínas necesarias de fuentes de proteínas vegetales. Fuentes importantes de proteínas vegetales son, por ejemplo, cultivos oleaginosos, legumbres y cereales. Cuando, por ejemplo, se incluye harina de soja en el pienso para animales monogástricos tales como los cerdos y las aves de corral, una proporción significativa de los sólidos de la harina de soja no se digiere. Por ejemplo, se han informado digestibilidades ileales aparentes de proteína de solo el 77% y el 84% en lechones y cerdos en crecimiento, respectivamente.

35

30

De hecho, los granos de cereal, las legumbres y los tubérculos contienen una serie de factores antinutricionales y alérgenos potenciales tales como inhibidores de alfa-amilasa/tripsina presentes en trigo, cebada y cereales relacionados, o inhibidores de tripsina de soja (inhibidores de tipo Kunitz y/o inhibidores de Bowman-Birk) que impiden un rendimiento óptimo del crecimiento, pueden alterar la salud del animal y provocar una liberación innecesaria de nitrógeno en el medio ambiente.

40

La mayor parte de los órganos de almacenamiento de plantas, tales como semillas y tubérculos, contienen el 1-10% de sus proteínas totales como inhibidores de proteasa con diferentes propiedades bioquímicas y estructurales que inhiben los diferentes tipos de proteasas. Los inhibidores proteicos se clasifican según el tipo de enzima que inhiben: inhibidores de la serina proteasa, inhibidores de la proteasa aspártica o inhibidores de la metalocarboxi proteasa.

45

50

Los alérgenos vegetales son un grupo generalizado de proteínas vegetales que comprenden las superfamilias de cupina y prolamina, así como las moléculas proteináceas del sistema de defensa de la planta. La superfamilia de prolamina incluye varios tipos importantes de alérgenos de legumbres, frutos secos, cereales, frutas y verduras, y los inhibidores de alfa-amilasa y proteasa de cereales. Basándose en la similitud estructural, los inhibidores de alfa-amilasa proteináceos con origen vegetal generalmente se clasifican en seis familias, que incluyen de tipo lectina, de tipo knottina, proteínas de CM, de tipo Kunitz, de tipo c-purotionina y de tipo taumatina (Richardson, 1991). Las proteínas de CM (cloroformo-metanol) son una gran familia de proteínas de semillas de cereales que contienen de 120 a 160 residuos de aminoácidos y cinco enlaces disulfuro. Muestran un típico dominio de alfa-amilasa/tripsina de doble cabeza. Esta característica posibilita que inhiban la actividad de alfa-amilasa y de enzimas de tipo tripsina. El inhibidor de alfa-amilasa 0.19 es uno de los inhibidores más estudiados de esta familia; presenta una amplia especificidad e inhibe las alfa-amilasas de insectos, aves y mamíferos. El inhibidor de la tripsina de la soja (tipo Kunitz) fue descubierto por primera vez por Kunitz en 1945.

55

60

El documento WO 2011/137322 ha divulgado recientemente que los miembros de la familia de los inhibidores de la alfa-amilasa/tripsina contenidos en el trigo y los cereales relacionados son fuertes inductores de una respuesta inmunitaria innata en el intestino humano. En animales de granja, este efecto se traduce en un rendimiento animal inferior al óptimo, una digestibilidad reducida e inflamación intestinal.

65

El uso de enzimas exógenas en piensos para animales ha sido una de las estrategias más prometedoras para mejorar el rendimiento animal, tal como se resume en una revisión reciente por Munir y Maqsood, EJFA, 2013, 25: 66-80.

El documento WO 2011/137322 ha divulgado el uso de anticuerpos contra la alfa-amilasa CM 3 para tratar pacientes celíacos o composiciones alimentarias, y considera el uso de la proteasa como una alternativa. Sin embargo, no menciona nada con respecto a una enzima específica para hidrolizar eficazmente los inhibidores de alfa-amilasa/tripsina o los inhibidores de tripsina de soja en el aparato gastrointestinal de los animales con el objetivo de mejorar la digestibilidad y el rendimiento animal.

Sería deseable proporcionar una forma segura, eficaz y económica para degradar los inhibidores de alfaamilasa/tripsina de los cereales, así como los inhibidores de la tripsina de legumbres, semillas oleaginosas y tubérculos en el aparato gastrointestinal de animales de granja alimentados con composiciones que comprenden dichos inhibidores, a fin de reducir la inflamación intestinal, reducir la excreción de nitrógeno y mejorar el rendimiento animal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15

5

10

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que una enzima, la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*, tiene un gran potencial para hidrolizar alérgenos/factores antinutricionales vegetales tales como inhibidores de alfa-amilasa y/o tripsina en el aparato gastrointestinal de un animal, lo que conduce a un mejor rendimiento animal, a una reducción de la excreción de nitrógeno y a una reducción de la inflamación intestinal.

20

La presente invención, que se define por las reivindicaciones, se refiere así al uso de la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* en una composición de pienso que contiene cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos para mejorar el rendimiento animal.

La peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* (AGP) anteriormente llamada aspergilopepsina II aislada de *Aspergillus niger var. macrosporus* (EC 3.4.23.19) es una proteasa única que pertenece a la familia de las peptidasas A4. Esta enzima no es homóloga a las proteasas aspárticas que pertenecen a las peptidasas de la familia A1, que son proteasas ácidas de tipo pepsina típicas, por lo que son insensibles a sus inhibidores específicos tales como la pepstatina A. Por lo tanto, esta enzima también se clasificó como una proteinasa ácida "insensible a la pepstatina". Entre las peptidasas glutámicas conocidas hasta la fecha, la AGP es característica porque es la única enzima bicatenaria. La secuencia de aminoácidos de la enzima no presenta homología con las de las proteinasas aspárticas típicas.

La expresión peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* según la presente invención incluye enzimas que tienen al menos un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* (identificador de UniProtKB/Swiss-Prot P24665), por ejemplo una enzima que tiene al menos el 80, 85, 90, 95, 98, 99% de identidad con P24665. Las enzimas homólogas más preferidas según la presente invención son la peptidasa scytalido-glutámica de *Scytalidium lignicolum*, peptidasas ácidas B y C de *Crypphonectria parasitica*, y una proteasa ácida de *Sclerotina sclerotiorum*.

40

45

50

35

La peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*, tal como se divulga en el presente documento, puede estar presente en forma pura, o como una preparación que comprende la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*, en la que al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad de proteasa se deriva de la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*, expresándose la actividad en HPU (Unidades de Histidina Proteasa); una HPU es la cantidad de enzima que hidroliza una cantidad de hemoglobina por minuto que proporciona una solución con una densidad óptica a 275 nm igual a la densidad óptica de una solución que contiene 1 µg de L-tirosina por ml en una solución de 0,1 mol/l de HCl. Las condiciones del ensayo son: pH 1,75, temperatura 40 °C, concentración de hemoglobina durante la incubación 16,7 g/l.

Actividad (HPU/mI) = $(DO_{muestra} - DO_{blanco} / S) \times 11/30$

En la que:

DO_{muestra}: Densidad óptica del filtrado de la muestra (275 nm)

55

DO_{blanco}: Densidad óptica del filtrado del blanco de la muestra (275 nm)

S: DO de una solución patrón de L-tirosina de 1,1 µg/ml (ml/ng)

60 30:1

30: tiempo de incubación (minutos)

11: volumen total de la mezcla de reacción (ml).

La peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* según la presente invención se puede preparar tal como se describe en Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J. Barret, N.D. Rawlings y J.F. Woessner eds.; Academic Press; or en el documento PCT/EP2013/066899.

Según la presente invención, el rendimiento animal mejorado se caracteriza por una proporción de conversión de pienso mejorada, una ganancia de peso diaria mejorada, una digestibilidad mejorada, una reducción de la excreción de nitrógeno y/o una inflamación intestinal reducida. El rendimiento animal puede evaluarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, y generalmente se caracteriza por la proporción de conversión de pienso, ingesta de pienso, digestibilidad, ganancia de peso, rendimiento de las canales. La inflamación intestinal reducirá la ingesta de pienso o reducirá la digestibilidad.

5

10

15

20

35

40

45

50

55

60

65

El término "animal" incluye a todos los animales, incluidos los seres humanos. El animal, según la presente invención, es un animal monogástrico (estómago con una sola cámara), de forma más preferida es un animal monogástrico seleccionado de entre animales no rumiantes, particularmente: mascotas (que incluyen, pero sin limitación, caballos, gatos y perros), aves de corral (incluidas, pero sin limitación, pavos, patos y pollos), cerdos o animales porcinos (incluidos, pero sin limitación, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas), peces (incluidos, entre otros, salmón, trucha, tilapia, pez gato y carpa), y conejo.

El término "pienso" o la expresión "composición de pienso" significa cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuada para, o destinada a, alimentar a un animal. En una forma de realización, el pienso tiene un contenido de energía (por ejemplo, están exceptuados compuestos terapéuticos). En otra forma de realización, están incluidas en el pienso una o más proteínas vegetales. Estas pueden derivarse en parte de legumbres, por ejemplo: habas de soja, alubias o guisantes, en parte de cereales, por ejemplo: trigo, cebada o maíz, en parte de semillas oleaginosas, por ejemplo: semillas de girasol o semillas de colza, y/o en parte de tubérculos, por ejemplo: patatas. En el uso según la invención, la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* puede administrarse al animal antes, después o simultáneamente con la dieta. Se prefiere esta última.

Por supuesto, la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* se debe administrar en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la digestión y/o la degradación de inhibidores de amilasa/tripsina, inhibidores de Kunitz y/o inhibidores de Bowman-Birk, mejorando así el valor nutricional del pienso. Actualmente se contempla que la enzima se administre en, por ejemplo, una o más de las siguientes cantidades: de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg de enzima/kg de pienso para animales; o preferentemente de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 50 mg de enzima/kg de pienso para animales, de forma más preferida de 0,1 a 10 mg de enzima/kg de pienso para animales.

La dosis diaria normal de una enzima proporcionada a un animal mediante la alimentación con pienso depende del tipo de animal y su condición y se puede ajustar fácilmente por un experto en la técnica. Para el uso según la presente invención, el pienso comprende una cantidad de unidades enzimáticas de peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* por kg de pienso que es capaz de digerir del 60 al 95% de los inhibidores de alfa-amilasa/tripsina que porta el trigo, la soja o cereales relacionados. Preferentemente, la composición de pienso comprende de 1 a 10.000 HPU/kg de pienso, de forma más preferida de 10 a 5.000 HPU/kg de pienso, de forma incluso más preferida de 50 a 1.000 HPU/kg de pienso.

El rendimiento animal mejorado se mide preferentemente como una proporción de conversión de pienso mejorada, ganancia de peso diaria mejorada, digestibilidad mejorada y/o inflamación intestinal reducida. La proporción de conversión de pienso (FCR) se puede determinar sobre la base de un ensayo de crecimiento animal estándar que comprende un primer tratamiento en el que la enzima se añade al pienso para animales en una concentración adecuada por kg de pienso y un segundo tratamiento (control) sin adición de la enzima al pienso para animales. La FCR se calcula como la ingesta de pienso en g/animal con respecto a la ganancia de peso en g/animal. Como se sabe en general, una FCR mejorada es más baja que la FCR de control. De forma más preferida para el presente uso, una proporción de conversión de pienso mejorada significa una reducción de al menos el 1% medida en un ensayo de rendimiento animal convencional. Preferentemente, la proporción de conversión de pienso se reduce en al menos el 2%, de forma más preferida en al menos el 3,5%.

Para la realización del uso de la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* para los piensos para animales, la enzima puede incorporarse en el pienso mediante procedimientos conocidos de por sí en la técnica de formulación y procesamiento de piensos. En una forma de realización particular, la enzima se formula como un gránulo de enzima que comprende una sal de cinc de un ácido orgánico, a fin de hacerla resistente a la granulación por vapor tal como se describe en el documento US 2008/0031998. Así, la presente invención se refiere al uso de la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* en una composición de pienso que contiene trigo, cebada o soja para mejorar el rendimiento animal, en la que la enzima peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* se encuentra en forma de un gránulo que comprende una sal de cinc de un ácido orgánico. La sal de cinc de un ácido orgánico es, en una forma de realización particular, soluble en agua. Cuando se trabaja con piensos para animales, es importante que los materiales utilizados en el gránulo tengan una determinada pureza; por lo tanto, en una forma de realización de la presente invención, la sal de cinc del ácido orgánico es de calidad alimentaria. La sal de cinc orgánica de un ácido orgánico se puede seleccionar, pero sin limtación, del grupo que consiste en sales de cinc de citrato, malato, maleato, malonato, metionato, succinato, lactato, formiato, acetato, butirato, propionato, benzoato, tartrato, ascorbato, gluconato, quelatos de cinc de hidratos de aminoácidos y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización particular de la presente invención, la sal de cinc de un ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en sales de cinc de citrato, malato, maleato, malonato, metionato, succinato, lactato, formiato, acetato y quelatos de cinc de hidratos de aminoácidos. La sal de cinc de un ácido orgánico puede seleccionarse del grupo que consiste en citrato de cinc, malato de cinc, maleato de cinc, malonato de cinc, metionato de cinc, succinato de cinc, lactato de cinc, formiato de cinc, acetato de cinc, butirato de cinc, propionato de cinc, benzoato de cinc, tatrato de cinc, ascorbato de cinc, gluconato de cinc, metionato de cinc, cinc-lisina, cinc-metionina y combinaciones de los mismos. La sal de cinc de un ácido orgánico puede seleccionarse del grupo que consiste en citrato de cinc, malato de cinc, maleato de cinc, malonato de cinc, metionato de cinc, succinato de cinc, lactato de cinc, formiato de cinc, acetato de cinc, butirato de cinc, propionato de cinc, benzoato de cinc, tatrato de cinc, ascorbato de cinc, gluconato de cinc, metionato de cinc, cinc-lisina y combinaciones de los mismos.

Además, la composición de pienso según la presente invención puede comprender adicionalmente una o más enzimas exógenas adicionales seleccionadas de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (EC 3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6) o cualquier mezcla de las mismas.

- Preferentemente, la composición de pienso o aditivo de pienso según la presente invención comprende además una o más enzimas exógenas adicionales seleccionadas de otra proteasa (por ejemplo: RONOZYME-ProAct) y/o una fitasa (por ejemplo: RONOZYME-HiPhos).
- La presente invención se refiere a las composiciones y al uso de peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*.

 Por lo tanto, se refiere específicamente a una composición de pienso que contiene cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos para animales monogástricos que comprenden peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* con las formas de realización anteriores. Preferentemente, la composición de pienso comprende de 2 a 10.000 HPU/kg de pienso, de forma más preferida de 10 a 5.000 HPU/kg de pienso, de forma incluso más preferida de 50 a 1.000 HPU/kg de pienso.

En todas las formas de realización según la presente invención, los cereales se seleccionan de entre trigo, cebada, maíz o centeno, las legumbres se seleccionan de entre habas de soja, alubias o guisantes, las semillas oleaginosas se seleccionan de entre semillas de girasol o semillas de colza y los tubérculos son patatas. Preferentemente, los cereales se seleccionan de entre trigo, cebada, maíz y las legumbres se seleccionan de entre semillas de soja. En las formas de realización más preferidas de la invención preferida, los cereales son trigo y la legumbre es soja.

Por lo tanto, una composición de pienso preferida según la presente invención comprende cereales seleccionados de entre trigo, cebada o maíz, legumbres seleccionadas de entre soja, semillas oleaginosas y/o tubérculos, de forma más preferida comprende cereales seleccionados de trigo y legumbres seleccionadas de soja.

Ejemplos particulares de composiciones de pienso de la invención son los siguientes:

10

15

35

40

45

60

65

- Una composición de pienso que comprende (a) peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* (b) al menos una vitamina liposoluble, (c) al menos una vitamina hidrosoluble y/o (d) al menos un oligoelemento;
- Una composición de pienso para animales que comprende peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* y un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg de pienso.
- Una composición de pienso para animales que comprende peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger y
 50 un cereal seleccionado de entre trigo, cebada o cereales relacionados. Preferentemente, dicha composición de pienso comprende del 5 al 60% en peso de un cereal seleccionado de entre trigo, cebada o especies de cereales relacionadas, siendo, de forma más preferida, trigo.
- Las denominadas premezclas son ejemplos de aditivos para piensos de la invención. Una premezcla designa una mezcla preferentemente uniforme de uno o más microingredientes con diluyente y/o vehículo. Las premezclas se utilizan para facilitar la dispersión uniforme de microingredientes en una mezcla más grande.
 - En otra forma de realización, la presente invención se refiere a la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* para su uso en una composición de pienso que contiene trigo, cebada, soja o cereales relacionados para reducir la inflamación intestinal en un animal.

La presente invención puede usarse en un procedimiento para mejorar el rendimiento animal que comprende mejorar la proporción de conversión de pienso y/o mejorar la ganancia de peso diaria y/o reducir la excreción de nitrógeno y/o reducir la inflamación intestinal en un animal alimentado con cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos, que comprende administrar por vía oral una cantidad suficiente de peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*. De forma más preferida, los cereales se seleccionan de entre trigo o cebada, y la legumbre es

soja; de forma aún más preferida, el cereal es trigo y la legumbre es soja.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere al uso de la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* para el pretratamiento de piensos para animales o componentes de piensos para animales que contienen cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos. Preferentemente, los cereales se seleccionan de entre trigo o cebada y la legumbre es soja; de forma más preferida, el cereal es trigo y la legumbre es soja. El experto en la técnica estimará la cantidad de peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* que se va a añadir al pienso, y el tiempo requerido para degradar los inhibidores de proteasa dependiendo de la composición de pienso que se está tratando. Para piensos basados en trigo, se añade peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* a de 50 a 5000 HPU/kg de trigo, preferentemente a de 100 a 2000 HPU/kg de trigo.

Los inhibidores de proteasa de alérgenos de plantas degradados por la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* según la presente invención son preferentemente aquellos que se encuentran específicamente en el trigo, la cebada, el centeno, la avena y sus variedades relacionadas por cruces, tales como inhibidores de alfa-amilasa/tripsina, de forma más preferida, los alérgenos de plantas son CM 2, CM 3, CM 16, y 0.19, y de forma incluso más preferida CM 3 y 0.19, sobre la base de su rápida degradación por la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*. El identificador de secuencias de aminoácidos de CM 3 es SwissProt P01083, mientras que el identificador de secuencias de aminoácidos de 0.19 es Swiss Prot P01085. Además, los inhibidores de la proteinasa de soja de tipo Kunitz (Swiss Prot ID: P01070) y de tipo Bowman-Birk (Swiss Prot ID: P01055) también se degradan de forma eficaz por la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*, contribuyendo de esta manera a la mejora del rendimiento animal.

La cantidad preferida de *enzima* que se va a añadir a la composición de pienso en el procedimiento anterior depende de la matriz de pienso y de la cantidad estimada de inhibidor de alfa-amilasa/tripsina.

En otra forma de realización más, la presente invención se refiere a un pienso preparado mediante el procedimiento anterior para degradar inhibidores de amilasa/proteasa en una composición de pienso que comprende incubar una composición de pienso que contiene alérgenos de plantas/inhibidores de proteasa con peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* durante un tiempo suficiente para hidrolizar alergenos de plantas/inhibidores de proteasa, comprendiendo dicha composición de pienso inhibidores de alfa-amilasa/tripsina degradados.

El uso de la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* con todas las formas de realización anteriores en una composición alimenticia que contiene cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos permite mejorar la digestibilidad de las proteínas en seres humanos.

El uso de la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* para el pretratamiento de un alimento o un producto alimenticio que contenga cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos puede evitar el pretratamiento térmico durante el procesamiento. El producto alimentario preferido es el ingrediente alimenticio que contiene soja.

40 LEYENDA DE LAS FIGURAS

5

10

15

20

25

30

35

45

55

<u>Figura 1</u>: análisis por SDS-PAGE al 4-12% (4 a 12% de gel Bis-Tris) de varias incubaciones de inhibidores de alfaamilasa de trigo con diferentes proteasas más pepsina en condiciones estomacales simuladas. Se incluyen dos controles con tratamiento con pepsina sin enzima adicional. La flecha indica la posición de los tres productos proteicos principales presentes en la preparación de alfa-amilasa.

- Marcadores de peso molecular: carriles 1, 2 y 15

- Tratamiento de endoproteasa específica de prolina de A. niger a: t = 0, carril 3; t = 90 minutos, carril 4- Peptidasa aspergiloglutámica de A. niger a: t = 0, carril 5; t = 90 minutos, carril 6- Pepsina a: t = 0, carril 7; t = 90 minutos, carril 8- Papaína a t = 0, carril 9; t = 90 minutos, carril 10- Multifect PR 15 L a: t = 0, carril 11; t = 90 minutos, carril 12- Aspergilopepsina I a: t = 0, carril 13; t = 90 minutos, carril 14- Pepsina a: t = 0, carril 16; t = 90 minutos, carril 17

50 <u>Figura 2</u>: SDS-PAGE preparativa de inhibidores de la alfa-amilasa de trigo para identificar la naturaleza de las proteínas más abundantes presentes en las bandas B1 a G1.

figura 3: análisis por SDS-PAGE al 4-12% (4 a 12% de gel Bis-Tris) de varias incubaciones de inhibidores de tripsina-quimiotripsina derivados de soja con diferentes proteasas más pepsina en condiciones estomacales simuladas. Se incluyen un control con tratamiento con pepsina sin enzima adicional. La flecha indica la posición del producto proteico principal superior presente en el inhibidor de tripsina-quimotripsina derivado de la soja que se

degrada.

- Marcadores de peso molecular: carril M

- Pepsina a: t = 0, carril 1; t = 60 minutos, carril 2- Endoproteasa específica de prolina de *A. niger* a: t = 0, carril 3; t = 60 minutos, carril 4- Peptidasa aspergiloglutámica de *A. niger* a: t = 0, carril 5; t = 60 minutos, carril 6- Multifect PR 15 L a: t = 0, carril 7; t = 60 minutos, carril 8- Aspergilopepsina I a: t = 0, carril 9; t = 60 minutos, carril 10

<u>Figura 4:</u> análisis por SDS-PAGE al 4-12% (4 a 12% de gel Bis-Tris) de varias incubaciones de purotioninas derivadas de trigo con diferentes proteasas más pepsina en condiciones estomacales simuladas. La flecha indica la posición de las purotioninas purificadas.

- Marcadores de peso molecular: carriles 1, 2, 9 y 10.
- 10 Peptidasa aspergiloglutámica de A. niger a: t = 0, carril 3; t = 90 minutos, carril 4
 - Endoproteasa específica de prolina de A. niger a: t = 0, carril 5; t = 90 minutos, carril 6
- Multifect PR 15 L (proteasa tipo aspergilopepsina I de *Trichoderma reesei*) a: t = 0, carril 7; y t = 90 minutos, carril 15 8.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

20

<u>Ejemplo 1</u>: La peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* escinde eficazmente nhibidores de alfaamilasa/tripsina derivados de trigo en condiciones estomacales simuladas, mientras que otras endoproteasas ácidas no son eficaces.

25 <u>Materiales y procedimientos</u>

Producción de aspergilopepsina I a partir de Aspergillus niger

El gen para la aspergilopepsina I de Aspergillus niger (*pepA*; An14g04710) se sobreexpresó en un huésped de *A. niger* utilizando procedimientos tales como los descritos en el documento WO 98/46772. El documento WO 98/46772 describe cómo seleccionar transformantes en placas de agar que contienen acetamida y seleccionar integrantes multicopia específicos. Los transformantes de *A. niger* que contienen múltiples copias del casete de expresión se seleccionaron para la generación posterior de material de muestra. La cepa de *A. niger* transformada se fermentó en un medio de fermentación CSM modificado, pH 6,2 (40 g/l de maltosa, 30 g/l de Bacto-soytone, 70 g/l de citrato de sodio tribásico dihidratado, 15 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1 g/l de NaH₂PO₄*2H₂O, 1 g/l de de MgSO₄*7H₂O, 1 g/l de L-Arg, 0,25 ml/l de antiespumante Clerol Antifoam). El caldo de cultivo obtenido se filtró, se filtró de forma estéril y luego se concentró mediante ultrafiltración. La cromatografía se llevó a cabo aplicando la enzima a una columna de Q-sepharose XK 26/10 en 50 mmol/l de acetato de sodio, pH 5,6, operación seguida de elución con un gradiente de sal. La presencia de la proteína aspergilopepsina I en las diversas fracciones se cuantificó evaluando la intensidad de las bandas de proteínas coloreadas después de SDS-PAGE al 4-12% (NuPAGE Bis-Tris Gel, Invitrogen).

Ensayo enzimático

- Se llevaron a cabo incubaciones en 50 mmol/l de citrato de Na a pH 4,0 durante 90 minutos a 37 °C. En todas las incubaciones relevantes, la pepsina estaba presente en una concentración de proteína enzimática de 0,2 mg/ml. La endoproteinasa específica de prolina se analizó en una concentración de 0,5 mg de proteína enzimática/ml, las otras endoproteinasas ácidas en una concentración de 0,05 mg de proteína enzimática/ml. Por último, se añadió inhibidor de amilasa y estaba presente en una concentración de 2 mg/ml.
- At = 0, se transfirieron 100 microlitros de la mezcla de reacción a 400 microlitros de TCA al 25%. Después de 90 minutos de incubación a 37 °C, se transfirieron otros 100 microlitros a 400 microlitros de solución de TCA nueva. Después de 2 horas a 4 °C, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14.000 rpm. Después de la centrifugación, se añadieron 65 microlitros de tampón de fosfato, pH 7, 25 microlitros de dodecilsulfato de litio (LiDS) y 10 microlitros de agente reductor de muestra. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante la noche y después se prepararon para la SDS-PAGE siguiendo el protocolo de Invitrogen (Invitrogen, www.lifetechnologies.com)

Determinación de la actividad de peptidasa aspergiloglutámica de A. niger (HPU)

Se suspendieron 20,0 g de hemoglobina de sangre bovina (producto Sigma H2625) en aproximadamente 700 ml de agua con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de 3,73 g de cloruro de potasio (KCI), el pH se ajustó a 1,75 con 0,5 mol/l de ácido clorhídrico. El volumen de la suspensión de hemoglobina se ajustó a 1 l con agua. El pH se verificó de nuevo y se ajustó a pH 1,75.

Se prepararon soluciones enzimáticas disolviendo peptidasa aspergiloglutámica purificada producida tal como se ha descrito anteriormente en un tampón KCI/HCl que contenía 3,73 g/l de KCl ajustadas a pH 1,75 con 2,0 mol/l de HCl. Para evaluar la actividad de la peptidasa aspergiloglutámica, se calentaron 5 ml de la solución de hemoglobina a 40 °C y subsiguientemente se añadió 1 ml de solución de enzima con una actividad de entre 5 y 25 unidades de histidina proteasa (HPU/ml) para comenzar la reacción. Después de 30 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 5 ml de solución de ácido tricloroacético (140 g/l) para precipitar fragmentos de péptidos más grandes. Se realizó una medición en blanco añadiendo 1,0 ml de muestra de enzima a una mezcla de 5 ml de solución de hemoglobina y 5 ml de solución de ácido tricloroacético. Los tubos se incubaron a 40 °C durante 30 minutos para completar la precipitación. Después de la centrifugación, la densidad óptica del sobrenadante transparente que contenía péptidos pequeños se midió a 275 nm. El resultado se comparó con una solución de L-tirosina de 1 μg/ml.

Una HPU es la cantidad de enzima que hidroliza una cantidad de hemoglobina por minuto que proporciona una solución con una densidad óptica a 275 nm igual a la densidad óptica de una solución que contiene 1 μg de Ltirosina por ml en una solución de 0,1 mol/l de HCl. Las condiciones del ensayo son: pH 1,75, temperatura 40 °C, concentración de hemoglobina durante la incubación 16,7 g/l.

Actividad (HPU/mI) = (DO_{muestra} - DO_{blanco} / S) x 11/30

25 En la que:

5

10

15

20

30

40

45

50

DO_{muestra}: Densidad óptica del filtrado de la muestra (275 nm)

DO_{blanco}: Densidad óptica del filtrado del blanco de la muestra (275 nm)

S: DO de una solución patrón de L-tirosina de 1,1 µg/ml (ml/µg)

30: tiempo de incubación (minutos)

35 11: volumen total de la mezcla de reacción (ml)

Análisis CL-EM/EM

Digestión in vitro

La muestra se disolvió a 1 mg/ml en agua MilliQ. La solución se diluyó 10 veces en NH_4HCO_3 100 mM (pH 7,8). La muestra se redujo mediante la adición de DTT, 5 mM, 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y se alquiló mediante la adición de yodoacetamida (IAA), 5,5 mM, 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad. La digestión con tripsina se realizó a 37 $^{\circ}C$ durante la noche.

Digestión en gel

Se cortaron bandas de gel utilizando el cortador de manchas ExQuest (Biorad, Hercules, CA, Estados Unidos) y se transfirieron a una MTP de unión a proteína lo (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los trozos de gel se lavaron añadiendo 75 μl de NH₄HCO₃ 50 mM para hinchar y 75 μl de acetronitrilo para encoger, un total de 3 lavados. Los trozos de gel lavados se digirieron con digestión con tripsina que se realizó mediante incubación a 37 ºC durante la noche. Las muestras se sometieron a sonicación durante 1 minuto y el sobrenadante se recogió en un vial de inyección.

55 Análisis por CL-EM/EM

Las muestras se acidificaron con ácido fórmico al 1% y se analizaron en un aparato Accela-LTQ-Velos (Thermo Scientific, San Diego, CA, Estados Unidos). La separación cromatográfica se logró con una columna de 2,1 x 100 mm, tamaño de partícula de 1,8 micrómetros, tamaño de poro de 80 Å, C-18 Eclipse XDB Zorbax (Agilent Santa Clara, CA, Estados Unidos) utilizando una elución en gradiente con (A) agua de grado CL-EM que contiene el 0,1% de ácido fórmico B) solución de acetonitrilo de grado CL-EM que contiene el 0,1% de ácido fórmico (Biosolve BV, Países Bajos) como fases móviles. El gradiente fue de 5 a 40% de B en 83 minutos. El caudal se mantuvo a 0,4 ml/min, utilizando un volumen de inyección de 25 μl y la temperatura de la columna se estableció en 50 °C. La adquisición de datos de la EM se realizó utilizando una adquisición dependiente de los 10 datos principales con un intervalo de masa de 400-2000 m/z, utilizando exclusión dinámica e incluyendo los estados de carga 2 y 3 solamente. Los experimentos de EM/EM se realizaron con una anchura de aislamiento establecida en 3,0, y la

energía de colisión normalizada se estableció en 35. Las búsquedas en la base de datos se realizaron con el motor de búsqueda Sorcerer 2 (Sorcerer™ -SEQUEST®) y el Trans Proteome Pipeline (TPP), utilizando tripsina como enzima preferida. Solo se consideraron las proteínas identificadas con una confianza > 90%. Los datos se contrastaron con la base de datos Swissprot.

Resultados

5

10

15

20

25

30

55

En el presente ejemplo demostramos (véase la figura 1) que, en condiciones gástricas simuladas, solo la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*, entre una serie de endoproteinasas ácidas, es capaz de degradar eficazmente una preparación purificada que incorpora varios inhibidores de alfa-amilasa de trigo (inhibidor de alfa-amilasa de la semilla de trigo, Tipo 1, Sigma). En el experimento se compararon las eficacias de las siguientes enzimas en presencia de pepsina (control):

- pepsina (mucosa gástrica porcina, sigma),
- endoproteinasa específica de prolina de Aspergillus niger (MaxiPro PSP, DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos)
- papaína (Collupuline, DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
- peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*, también denominada aspergilopepsina II (MaxiPro HSP, DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
- aspergilopepsina I (véase Materiales y procedimientos),
- Multifect PR 15 L (proteasa tipo aspergilopepsina I de Trichoderma reesei; http://biosciences.dupont.com).

Los resultados (véase la figura 1), muestran que la preparación del inhibidor de la alfa-amilasa de gluten de trigo purificada incorpora tres bandas de proteínas principales con un tamaño de aproximadamente 12 kDa (véase la flecha). Estos datos también muestran que en condiciones estomacales simuladas y en presencia de pepsina y a iguales cantidades de las diversas proteinasas, la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* es más eficaz en la degradación de estas tres bandas principales presentes en una preparación purificada de inhibidores de alfamilasa.

- Para confirmar la naturaleza de las diferentes proteínas presentes en cada una de estas bandas, se cortaron muestras de bandas de gel, se extrajeron y las proteínas presentes se identificaron usando análisis por CL-EM/EM tal como se describe en Materiales y procedimientos anteriormente.
- En este caso, los 10 mg/ml de la solución de inhibidor de alfa-amilasa Sigma se diluyeron 10 veces con agua.

 Después se mezclaron 65 microlitros de esta solución con 25 microlitros de tampón de muestra LiDS y 10 microlitros del agente reductor de muestra, se calentaron durante 10 minutos a 70 °C, después de lo cual las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE según el protocolo de Invitrogen. A continuación, el gel se fijó durante 1 hora con metanol al 50%/ácido acético al 7%, se enjuagó dos veces con agua desmineralizada y se tiñó con Sypro Ruby durante la noche. Las muestras de gel se obtuvieron de las tres bandas, presumiblemente de inhibidor de alfa-amilasa, tal como se ilustra en la figura 2. Según los datos de CL-EM/EM obtenidos de las proteínas extraídas, las proteínas más abundantes presentes en las bandas C1 y B1 son los inhibidores de alfa-amilasa de trigo con los números de acceso de SwissProt P17314 (CM 3) y P16159 (CM 16), en las bandas G1 y F1 P01083 (CM 3).
- Este dato demuestra que la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* es sorprendentemente la más eficaz en la degradación de inhibidores de alfa-amilasa derivados de trigo en condiciones estomacales y, especialmente, los inhibidores de alfa-amilasa de trigo: CM 2, CM 3, CM 16 y 0.19.

Ejemplo 2: Aditivo para piensos para animales

Se prepara un aditivo para piensos para animales mediante la adición de 100.000 HPU de peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* a la premezcla siguiente (por kilogramo de premezcla):

1100000 IE	Vitamina A	50004 mg	Cloruro de colina
300000 IE	Vitamina D3	6000 mg	Fe
4000 IE	Vitamina E	3000 mg	Cu
250 mg	Vitamina B1	5400 mg	Zn
800 mg	Vitamina B2	8000 mg	Mn

1200 mg	D-pantotenato de Ca	124 mg	1
500 mg	Vitamina B6	60 mg	Co
2,5 mg	Vitamina B12	29,7 mg	Se
5000 mg	Niacina	9000 mg	Lasalocid Sodio (Avatec)
10000 mg	Vitamina C	17,3%	Ca
300 mg	Vitamina K3	0,8%	Mg
15 mg	Biotina	11,7%	N/A
150 mg	Ácido fólico		

Ejemplo 3: Pienso para animales

Se prepara una dieta de engorde para pollos de engorde con la composición siguiente (%, p/p) mezclando los ingredientes. El trigo, el centeno y el SBM 48 están disponibles de Moulin Moderne Hirsinque, Hirsingue, Francia. Después del mezclado, el pienso se granula a una temperatura deseada, por ejemplo aproximadamente 70 °C (3 x 25 mm).

Trigo	46,00
Centeno	15,00
Harina de haba de soja (SBM 48)	30,73
Aceite de soja	4,90
DL-metionina	0,04
DCP (fosfato de dicalcio)	1,65
Caliza	0,43
Sal	0,15
TiO ₂	0,10
Aditivo para piensos para animales (anteriormente)	1,00

10 El pienso para animales resultante comprende 1000 HPU de peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* por kg.

Ejemplo 4: Pienso para lechones

15 Se puede preparar un pienso para lechones que contiene peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* mezclando los ingredientes siguientes entre sí utilizando un aparato de mezclado convencional a temperatura ambiente.

Ingrediente	Cantidad (% en peso)
Trigo	32,6
Maíz	18,7
Arroz	5,0
Salvado de trigo	9,0
Harina de soja	23,0
Aceite de soja	2,0
Almidón de trigo	4,5
Minerales *	2,9
Premezcla de aminoácidos sintéticos **	0,8
Premezcla de vitaminas y oligoelementos ***	1,0
Premezcla de peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger (10% en almidón de trigo	0,5

²⁰ En principio la premezcla de peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* puede contener el 1-20% de peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*.

^{*} Sal marina, fosfato dicálcico y carbonato de calcio;

5

25

30

*** Vitaminas A, E, D3, K3, B1, B2, B6, B12, C, biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, cloruro de colina, sulfato de cobre, sulfato de hierro, óxido de manganeso, óxido de cinc, carbonato de cobalto, yoduro de calcio y selenito de sodio.

Ejemplo 5: Pienso para cerdos en crecimiento

10 Se puede preparar un pienso para cerdos en crecimiento que contiene peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* mezclando los ingredientes siguientes entre sí utilizando un aparato de mezclado convencional a temperatura ambiente.

Ingrediente	Cantidad (% en peso)
Harina de soja	18,0
Maíz	52,3
Cebada	13,0
Harina de avena	6,0
Salvado de trigo	5,2
Aceite de soja	2,0
Minerales *	1,5
Premezcla de aminoácidos sintéticos **	0,5
Premezcla de vitaminas y oligoelementos ***	1,0

15 Premezcla de peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger (10% en almidón de trigo) 0,5

Ejemplo 6: Pienso iniciador para pollos de engorde

Se puede preparar un pienso ("iniciador") para pollos de engorde que contiene peptidasa aspergiloglutámica de 20 Aspergillus niger mezclando los ingredientes siguientes entre sí utilizando un aparato de mezclado convencional a temperatura ambiente.

Ingrediente	Cantidad (% en peso)
Harina de soja	34,50
Maíz	20,00
Trigo	37,80
Aceite de soja	3,13
Minerales *	2,90
Premezcla de aminoácidos sintéticos **	0,17
Premezcla de vitaminas y oligoelementos ***	1,00

Premezcla de peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger (10% en almidón de trigo) 0,50

Ejemplo 7: Pienso de engorde para pollos de engorde

Se puede preparar un alimento ("de engorde") para pollos de engorde que contiene peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger mezclando los ingredientes siguientes entre sí utilizando un aparato de mezclado convencional a temperatura ambiente.

Ingredientes	Cantidad (% en peso)
Harina de soja	31,2
Maíz	20,0
Trigo	41,3
Aceite de soja	3,4
Minerales *	2,5

^{**} Lisina, metionina y treonina;

Ingredientes	Cantidad (% en peso)
Premezcla de aminoácidos sintéticos **	0,1
Premezcla de vitaminas y oligoelementos ***	1,0
Premezcla de peptidasa aspergiloglutámica de <i>Aspergillus niger</i> (10% en almidón de trigo) 0.5	0,5

<u>Ejemplo 8</u>: La peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* escinde de forma eficaz inhibidores de la tripsina-quimotripsina derivados de soja en condiciones estomacales simuladas, mientras que otras endoproteasas ácidas no son eficaces.

Materiales y procedimientos

Ensayo enzimático

5

15

20

45

50

55

Se llevaron a cabo incubaciones en 50 mmol/l de citrato de Na a pH 4,0 durante 60 minutos a 37 °C. En todas las incubaciones relevantes, la pepsina estaba presente a una concentración de proteína enzimática de 0,2 mg/ml. Todas las peptidasas se analizaron a una concentración de 0,5 mg de proteína enzimática/ml. El inhibidor de inhibidores de tripsina-quimotripsina (adquirido de Sigma T9777) se añadió en último lugar y estaba presente a una concentración de 2 mg/ml.

A t=0, se transfirieron 100 microlitros de la mezcla de reacción a 400 microlitros de TCA al 25%. Después de 60 minutos de incubación a 37 $^{\circ}$ C, se transfirieron otros 100 microlitros a 400 microlitros de solución de TCA nueva. Después de 18 horas a 4 $^{\circ}$ C, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 14.000 rpm. Después de la centrifugación, se añadieron 65 microlitros de tampón de fosfato, pH 7, 25 microlitros de dodecilsulfato de litio (LiDS) y 10 microlitros de agente reductor de muestra y se prepararon para SDS-PAGE siguiendo el protocolo Invitrogen (Invitrogen, www.lifetechnologies.com)

Resultados

- En el presente ejemplo demostramos que, en condiciones gástricas simuladas, solo la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* entre varias endoproteinasas ácidas es capaz de degradar eficazmente una preparación purificada que incorpora tripsina-quimotripsina de soja, Sigma). En el experimento se compararon las eficacias de las enzimas siguientes en presencia de pepsina (control):
- pepsina (mucosa gástrica porcina, sigma),
 - endoproteinasa específica de prolina de Aspergillus niger (MaxiPro PSP, DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos)
- peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger*, también denominada aspergilopepsina II (MaxiPro HSP, DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos),
 - aspergilopepsina I (véase Materiales y procedimientos),
- Multifect PR 15 L (proteasa tipo aspergilopepsina I de Trichoderma reesei; http://biosciences.dupont.com).

Los resultados (véase la figura 3), muestran que la preparación purificada de inhibidor de tripsina-quimotripsina incorpora bandas de proteínas con un tamaño de aproximadamente 10 kDa. Estos datos también muestran que en condiciones estomacales simuladas y en presencia de pepsina y a iguales cantidades de las diversas proteinasas, la peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* es la más eficaz en la degradación de las bandas superiores presentes en una preparación purificada de inhibidores de tripsina-quimotripsina.

<u>Ejemplo 9</u>: La peptidasa aspergiloglutámica de *Aspergillus niger* escinde los inhibidores de alfaamilasa/tripsina de una forma dependiente de la dosis.

En el presente ejemplo determinamos la cantidad de proteína enzimática peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger que se requiere para hidrolizar en condiciones estomacales simuladas los inhibidores de alfa amilasa/proteasa presentes en 1 gramo de gluten de trigo. Para ello, se solubilizó gluten de trigo (Sigma) en 50 mmol/l de ácido cítrico, pH 4,0, a una concentración de 9,35 mg/ml. A esta mezcla bien agitada se añadió proteína enzimática pepsina para alcanzar una concentración final de 0,2 mg/ml y después se tomaron seis muestras de un ml. A estas seis muestras se añadieron cantidades crecientes de enzima peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger pura. A la muestra 1: no se añadió AGP, a la muestra 2: 0,09 mg, a la muestra 3: 0,19 mg, a la muestra 4: 0,28 mg, a la muestra 5: 0,37 mg y a la última muestra: 0,47 mg. Las diferentes muestras se incubaron a continuación durante 60 minutos a 37 grados centígrados y de cada muestra se tomaron partes alícuotas para el

análisis por SDS-PAGE a t = 0 minutos y t = 60 minutos. El análisis por SDS-PAGE se llevó a cabo según el protocolo de Invitrogen.

Los resultados (véase la figura 4) muestran que mediante la adición de 0,28 mg de peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger pura los inhibidores de alfa-amilasa/proteasa presentes en 9,35 mg de gluten de trigo pueden hidrolizarse dentro de un período de una hora. Esto implica que 30 mg de peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger pura (correspondientes a 15.000 HPU) puede hacer frente a 1 gramo de gluten de trigo en dichas condiciones gástricas simuladas. Así, después de la fragmentación parcial de los inhibidores de alfa amilasa/proteasa por medio de una preparación de administración oral de peptidasa aspergiloglutámica de A. niger, los péptidos inhibidores recién generados se degradarán adicionalmente a oligopéptidos no inmunogénicos por medio de pepsina durante el paso por el estómago y, después de penetrar en el duodeno, mediante proteasas pancreáticas tales como la tripsina y la quimotripsina.

REIVINDICACIONES

- 1. Una composición de pienso que contiene cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos para animales monogástricos que comprende peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger.
- 2. Una composición de pienso según la reivindicación 1, que comprende de 1 a 10.000 unidades de HPU de peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger por kg de pienso.
- 3. Una composición de pienso según las reivindicaciones 1 o 2, que además comprende
- (a) al menos una vitamina liposoluble;
 - (b) al menos una vitamina hidrosoluble y/o
- 15 (c) al menos un oligoelemento.
 - 4. Una composición de pienso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo además la composición de pienso otra proteasa y/o una fitasa.
- 20 5. Una composición de pienso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que tiene un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg.
 - 6. Una composición de pienso según cualquiera de las reivindicaciones 1 5 para reducir la proporción de conversión de pienso, mejorar la ganancia de peso diaria, mejorar la digestibilidad del pienso y/o reducir la excreción de nitrógeno.
 - 7. Uso de peptidasa aspergiloglutámica de Aspergillus niger para el pretratamiento de pienso para animales o componentes de piensos para animales que contienen cereales, legumbres, semillas oleaginosas y/o tubérculos.
- 8. Uso según la reivindicación 7, en el que los cereales se seleccionan de entre trigo, cebada o maíz y la legumbre es soja.

5

10

25

30

Figura 1

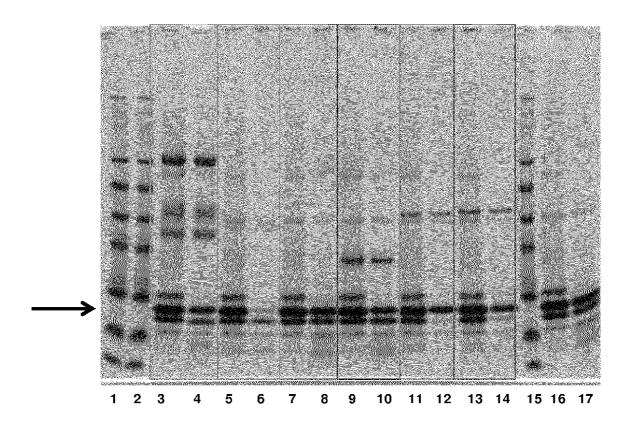


Figura 2

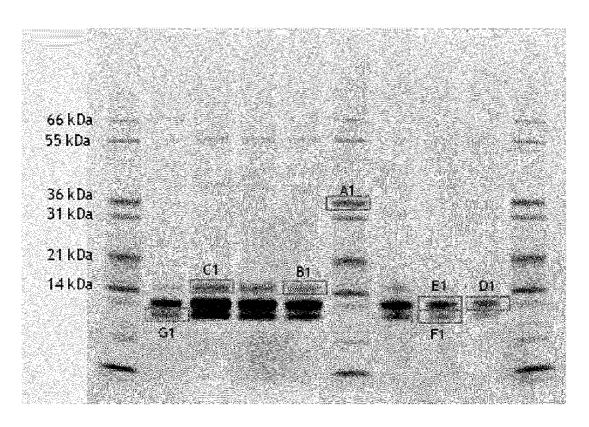


Figura 3

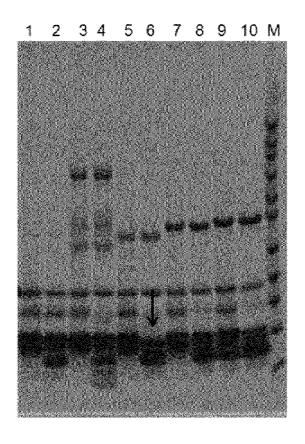


Figura 4

